

Aus dem Max v. Pettenkofer-Institut für Hygiene und
Medizinische Mikrobiologie der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. H. Eyer

Zur Wirkung und Auftrennung toxischer Komponenten aus enteropathogenen Coli-Bakterien

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Reichel
aus Selb

München 1976

Aus dem Max v. Pettenkofer-Institut für Hygiene und
Medizinische Mikrobiologie der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. H. Eyer

Zur Wirkung und Auftrennung toxischer Komponenten aus enteropathogenen Coli-Bakterien

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin

an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Reichel

aus Selb

München 1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr. H. Metz

Mitberichterstatter: Prof.Dr.Dr. H. Eyer

Dekan: Prof.Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Oktober 1976



Meinen Eltern gewidmet.

Gauting, im Oktober 1976

INHALTSVERZEICHNIS

- A) Einleitung
- B) 1. Materialien und Methoden
 - 1.1. Verwendete Bakterienstämme
 - 1.2. Kultivierung der Bakterien
 - 1.3. Herstellung und Behandlung des zellfreien Kulturüberstandes
 - a) Konzentration der aktiven Bestandteile durch Ausfällen mit Ammoniumsulfat
 - b) Erhitzen im Wasserbad
 - c) Behandlung mit Pronase
 - d) Behandlung mit Säure
 - e) Neutralisation mit Antiserum
 - f) Agar-Doppeldiffusionstest zur Untersuchung der Proben auf antigenes Material
 - 1.4. Membran-Ultrafiltration
 - a) Verfahren
 - b) Beschreibung der Apparatur und des Arbeitsvorganges
 - c) Fraktionierung des Kulturfiltrates durch Ultrafiltration
 - 1.5. Gelchromatographie
 - a) Verfahren
 - b) Charakteristische Größen der Chromatographiesäule
 - c) Beschreibung der Apparatur
 - d) Präparation der Säule
 - 1.6. Test der zu untersuchenden Proben auf aktive Substanz
 - 1.6.1. Auslösung von Rhythmusstörungen am isolierten Ileum des Kaninchens

1.6.2. Prüfung auf Durchlässigkeitserhöhung
von Hautkapillaren

- a) Vorbereitung des Tierversuches
- b) Injektion der Proben
- c) Beurteilung des Testes

C) 2. Ergebnisse

- 2.1. Ergebnis der gelchromatographischen
Auftrennung über Sephadex G 50
- 2.2. Ergebnis der gelchromatographischen
Auftrennung über Sephadex G 15
- 2.3. Ergebnis der Membran-Ultrafiltration
- 2.4. Vergleich der Ergebnisse aus Ultrafiltration
und Gelchromatographie über Sephadex G 50
- 2.5. Eigenschaften der Coli-Toxine
- 2.6. Versuche zur annähernden Bestimmung des
Molekulargewichtes der aktiven Substanz
 - 2.6.1. durch Membran-Ultrafiltration
 - 2.6.2. durch Gelchromatographie
 - a) Versuche mit Sephadex G 50
 - b) Versuche mit Sephadex G 15

D) Diskussion

E) Zusammenfassung

F) Literaturverzeichnis

A) Einleitung

Gorbach begleitete 1973 eine Gruppe von 133 amerikanischen Studenten nach Mexiko, mit dem Ziel, die Ursachen evtl. auftretender "Reisediarrhoen" zu eruieren. Von den 133 beobachteten Personen erkrankten tatsächlich 38 an Diarrhoe wechselnden Ausmaßes. Im Stuhl der Erkrankten konnten in 2 Fällen *Entamoeba histolytica* und in 26 Fällen enteropathogene Coli-Bakterien gefunden werden. Die restlichen Erkrankungen blieben ungeklärt. Immerhin weist diese Studie für 72% der Erkrankten *E.coli* als Erreger einer akuten Diarrhoe bei Erwachsenen aus. (11)

Das Wissen um die potentielle Enteropathogenität von Coli-Bakterien ist nicht neu. Seit langem ist die colibedingte Säuglingsenteritis bekannt, die bei epidemischem Auftreten, z.B. auf Neugeborenenstationen, besonders gefürchtet ist. Kauffman (18) berichtete 1951 darüber. In den folgenden Jahren wurde eine große Zahl enteropathogener Coli-Stämme isoliert. Einerseits wurden sie aus dem Stuhl Erwachsener gewonnen, die an choleraähnlicher Diarrhoe (4) erkrankt waren, so z.B. in Aden, Calcutta, Dacca usw., andererseits auch von erkrankten Kälbern und Schweinen.

Es gelang nicht, die Vielzahl der Stämme von *E.coli*, die aus dem Stuhl von an Diarrhoe erkrankten Menschen oder Tieren isoliert wurden, mit den herkömmlichen serologischen Methoden - mit Ausnahme der Enteritis-colibakterien - gemäß ihrer Pathogenität zu erfassen; Bakterien gleicher Antigenstruktur können sowohl pathogen als auch apathogen sein.

Über ein von der Antigenstruktur unabhängig gebildetes Toxin als den krankheitsauslösenden Faktor bei Coli-bakterien von Erwachsenen hat 1970 Gorbach berichtet. Er wies darauf hin (9), daß im Ligaturtest sowohl durch injizierte Bakterien als auch durch zellfreies Kulturfiltrat dieser Bakterien eine positive Reaktion hervorzurufen sei.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen stellte sich bald heraus, daß das Toxin aus zwei Komponenten unterschiedlichen Verhaltens gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen besteht, einem labilen, hochmolekularen und einem relativ stabilen, niedermolekularen Anteil. (4,13,16,17,21,26)

Smith und Halls (30) konnten zeigen, daß bei tierpathogenen Stämmen die Eigenschaft, das Toxin zu bilden, durch die Übertragung eines Plasmids an andere Stämme von *E.coli* weitergegeben werden kann. Das erklärt, weshalb die herkömmlichen serologischen Methoden versagen mußten. Für den Nachweis der Pathogenität bestimmter Stämme bleibt demnach zunächst nur der Nachweis des Toxines. Eine Vielzahl von Testmethoden wurde dafür beschrieben, Ligaturtest, Test durch intradermale Injektion mit Nachweis des Permeabilitätsfaktors, Thiry Vella Loop Test, orale Inokulation von jungen Schweinen, Mäusen und Kaninchen, Induktion der Steroidproduktion durch das Toxin in Kulturen von NNR-Tumorzellen; einige davon, z.B. Ligaturtest und Test auf den Permeabilitätsfaktor wurden aus der Choleraforschung übernommen. Metz beschrieb 1972 (22) eine weitere Untersuchungsmethode, die auch in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde. Bei dieser Methode kann am isolierten Ileum des Kaninchens die spezifische Wirkung von Enteritis-Colibakterien und ihrer Inhaltstoffe unmittelbar studiert werden.

1. Materialien und Methoden

1.1. Verwendete Bakterienstämme

Für alle Versuche wurde als pathogener Keim *Escherichia coli* O 78 : H 11, Labornummer H 10407 verwendet. Der pathogene Stamm H 10407 wurde von Evans aus dem Stuhl eines an choleraähnlicher Diarrhoe erkrankten Patienten in Dacca, Bangladesh, isoliert (4). Der als nicht enteropathogen bekannte Stamm 10405 diente als negative Kontrolle. Beide Stämme wurden uns freundlicherweise von Evans zur Verfügung gestellt.

1.2. Kultivierung der Bakterien

Zum Anzüchten der Bakterien wurde ein Casaminosäuren-Hefeextrakt-Medium verwendet (+). Jeweils 150 ml dieses Nährbodens wurde von Pepton-Schrägagarkulturen beimpft und 18 Stunden unter Schütteln bei 37°C bebrütet.

1.3. Herstellen und Behandlung des zellfreien Kulturüberstandes

- a) Konzentration der aktiven Bestandteile durch Ausfällen mit Ammoniumsulfat:
In einer Kühlzentrifuge wurden die Bakterien bei 6000 g für 20 min aus der Kultur abzentrifugiert, der

(+) Zusammensetzung des Casaminosäuren-Hefeextrakt-Mediums:

20,00 g Casaminosäuren	(Difco)
6,00 g Hefeextrakt	(Difco)
6,74 g K_2HPO_4	
1,00 ml Spurenelemente	(5,0% $MgSO_4$ 0,5% $MnCl$ 0,5% $FeCl_3$ in 1mmol H_2SO_4)

Aqua dest. ad 1000 ml.

Der pH wurde mit 1N NaOH auf 8,5 eingestellt. Anschließend wurde das Medium mittels eines Seitz-Filters sterilisiert.

Überstand für die weitere Verwendung durch einen Membranfilter (Sartorius, 0,45 μ) sterilfiltriert. Diesem Kulturfiltrat (KF) wurde unter ständigem Rühren bei Zimmertemperatur festes Ammoniumsulfat (AMS) zugegeben, bis eine ca. 90%-ige Sättigung der Lösung erreicht war. Für weitere 3 Stunden wurde die Lösung bei 4°C aufbewahrt, das entstandene Präzipitat sodann 30 min bei 13.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Präzipitat für die weitere Verwendung in physiologischer, Phosphat-gepuffelter NaCl-Lösung (PBS) (+) wieder aufgelöst, entsprechend etwa 1/40 des Ausgangsvolumens. Die so erhaltene Lösung wurde nochmals zentrifugiert, um partikuläre Verunreinigungen, die durch die Prozedur des Ausfällens entstanden, von der Chromatographiesäule fern zu halten.

Die gewonnenen Proben wurden durch folgende Ansätze auf ihre Stabilität gegenüber Hitze, Pronase, Säure und auf ihre Neutralisierbarkeit durch Antiserum bzw. auf Ihren Gehalt an antigenem Material untersucht:

- b) Hitze: 10 min im kochenden Wasserbad erwärmt;
- c) Pronase: 5 mg Pronase gelöst in 5 ml PBS wurden mit der Probe im Verhältnis 1:20 versetzt und 3 Stunden bei 37°C inkubiert;
- d) Säure: die Probe wurde mit 1N HCl auf pH 3 angesäuert, 1 Stunde bei Zimmertemperatur belassen und sodann mit 1N NaOH neutralisiert;

(+) Zusammensetzung der physiologischen, Phosphat-gepufferten NaCl-Lösung (PBS):

Stammlösung: 139,08 g NaCl
137,00 g K_2HPO_4
16,50 g KH_2PO_4
Aqua dest. ad 2000 ml.

Diese Stammlösung wird mit Aqua dest. 1:20 verdünnt; der pH beträgt dann 7,4.

- e) Antiserum: die Proben wurden mit Kaninchen-Antiserum gegen E.coli H 10407 (+) im Verhältnis 20:1 angesetzt und 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert;
- f) Agar-Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony zur Untersuchung auf antigenes Material: Objektträger wurden entfettet und mit 2 ml Ouchterlony-Agar (Ionagar Nr.2, 0,75% + 0,1% Natriumazid) beschichtet. Nach dem Abkühlen wurden mit einer Rosette aus 7 Stanzröhrchen Zylinder aus dem Agar herausgestanzt. Das zentrale Stanzloch wurde mit Antiserum gegen E.coli H 10407 (+) gefüllt, die umgebenden Löcher mit den zu untersuchenden Proben. Die Platten wurden nun für 24 Stunden bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer aufbewahrt und sodann abgelesen.

(+) Herstellung des Antiserums:

3 bis 5 kg schwere Kaninchen werden parenteral mit einer Suspension gewaschener, lebender Bakterien des Stammes H 10407 immunisiert. Die Suspension wurde standardisiert durch Einstellen der optischen Dichte auf 0,3 bei 546 nm. 6 Injektionen von je 1 ml Bakteriensuspension für die beiden ersten und je 2 ml für die folgenden 4 Injektionen wurden im Abstand von 3 bis 4 Tagen verabreicht, die 7. zu 2 ml nach weiteren 7 Tagen. Eine Woche später wurden die Tiere entblutet und das Serum durch Ausfällen der Eiweißbestandteile mit einer gesättigten AMS-Lösung (2 Teile Serum + 1 Teil AMS) und Auflösen des Präzipitates in PBS auf 1/5 des Ausgangsvolumens konzentriert. Das so gewonnene Antiserum hatte einen antitoxischen Titer von 1:120.

1.4. Membran-Ultrafiltration

a) Verfahren

Die Verwendung von Membranen verschiedener Porenweite ermöglicht es, ein Gemisch von Molekülen nach deren ungefährem Molekulargewicht zu fraktionieren. Ein Vorteil dieser Methode ist, daß Moleküle, deren Molekulargewicht über der Abscheidgrenze der Membran liegt, angereichert werden, ohne daß dabei die kleinen Moleküle ebenfalls konzentriert würden.

b) Apparatur und Arbeitsvorgang

Zur Durchführung der Filtration wird die Ultrafiltrationszelle (Firma AMICON) auf einen Magnetrührer gestellt, der ein Magnetstäbchen im Innern der Zelle in Bewegung hält. Die so erzielte Bewegung der Flüssigkeit verhindert, daß die zurückgehaltenen, großen Moleküle die Ultrafiltrationsmembran verstopfen.

Die Filtrationsgeschwindigkeit ist wesentlich beeinflussbar durch den angewandten Druck, dessen Höhe aber begrenzt wird durch

- α) die Druckfestigkeit der Filtrationskammer
- β) vom Hersteller angegebene, optimale Druckwerte
für großporige Membranen.

Der während des Versuches angewandte Druck betrug für die Membranen UM-2, PM-10 und XM-50 3 bis 4 kp/cm^2 , für die Membran XM-100 A 1 bis 1,5 kp/cm^2 . Er wurde mittels einer Stickstoffflasche erzeugt. Stickstoff schien deshalb besonders geeignet, weil durch ihn keine chemische Veränderung der zu untersuchenden Probe zu erwarten war.

Die einzelnen Membranen (AMICON) hatten Abtrenngrenzen für Moleküle mit einem Molekulargewicht zwischen 1.000 und 100.000. Gemäß den Angaben des Herstellers wurden die Membranen aufbereitet. Nach Beendigung der Filtration konnten sie in 0,1N NaOH ausgewaschen und in 10% Äthanol aufbewahrt werden.

Tabelle 1

Verwendete Ultrafiltrationsmembranen und deren
Abtrenngrenzen (Firma AMICON)

Membrantyp	Molekulargewichte, die den Abtrenngrenzen der Membranen entsprechen
UM-2	1.000
PM-10	10.000
XM-50	50.000
XM-100 A	100.000

c) Fraktionierung des Kulturfiltrates durch Ultra-
filtration

Unter Verwendung der Membranen XM-100 A, XM-50, PM-10
und UM-2 kann der zellfreie und sterilfiltrierte Kul-
turüberstand in 5 Fraktionen aufgeteilt werden:

Fraktion Nr.	darin enthaltene Molekulargewichte
1	>100.000
2	50.000 - 100.000
3	10.000 - 50.000
4	1.000 - 10.000
5	<1.000

Dabei wurde so vorgegangen, daß mit der größten Membran
begonnen, das Filtrat aufgefangen und auf die Membran
aufgebracht wurde, deren Abtrenngrenze eine Stufe nied-
riger liegt. Der Überstand über der Membran wurde auf
das Ausgangsvolumen aufgefüllt, um die ursprüngliche
Konzentration der retinierten Substanzen wieder herzu-
stellen.

Die gewonnenen Fraktionen wurden auf ihre Wirkung am
isolierten Ileum und auf der Haut des Albinokaninchens
geprüft.

1.5. Gelchromatographie

a) Verfahren

Die Gelchromatographie beruht auf dem Prinzip, daß verschieden großen Molekülen verschieden große Verteilungsräume zur Verfügung stehen. Dies wird im Fall der verwendeten Sephadex Gele dadurch erreicht, daß die Gelpartikel große "innere Hohlräume" aufweisen. In diese Hohlräume vermögen die das Gelbett passierenden Moleküle entsprechend ihrer Größe, also je nach Molekulargewicht, verschieden weit einzudringen. Großen Molekülen steht daher ein kleinerer Verteilungsraum zur Verfügung als kleinen Molekülen, im Extremfall nur der Raum zwischen den Gelpartikeln.

Fließt nun Lösungsmittel durch die Säule, so fließt es nur zwischen den Gelpartikeln, es bildet die mobile Phase. Die Flüssigkeit in den Gelporen hingegen bildet eine stationäre Phase. Zwischen beiden, mobiler und stationärer Phase, besteht für die das Gelbett passierenden Moleküle ein Diffusionsgleichgewicht. Je kleiner die Moleküle, desto größer der Anteil der stationären Phase, der durch Diffusion erreicht wird, desto länger auch die Verweildauer in der Säule.

Wird also ein Gemisch verschiedener Molekülgrößen auf die Säule aufgetragen und durch kontinuierlichen Nachfluß von Lösungsmittel aus dieser eluiert, so treten am anderen Ende zunächst die großen Moleküle aus, gefolgt von den kleineren, in der Reihenfolge abnehmender Molekülgröße. Ionisierten Salzen steht als den kleinsten der möglicherweise aufgebraachten Partikel praktisch der gesamte Verteilungsraum der Säule zur Verfügung, sie werden demnach zuletzt eluiert.

Die Verwendung verschieden stark quellender Gele mit verschieden großen "inneren Hohlräumen" ermöglicht eine genaue Anpassung des Auftrennbereiches an die zu reinigenden Molekülgrößen. Dieser Bereich liegt je

nach Geltyp zwischen

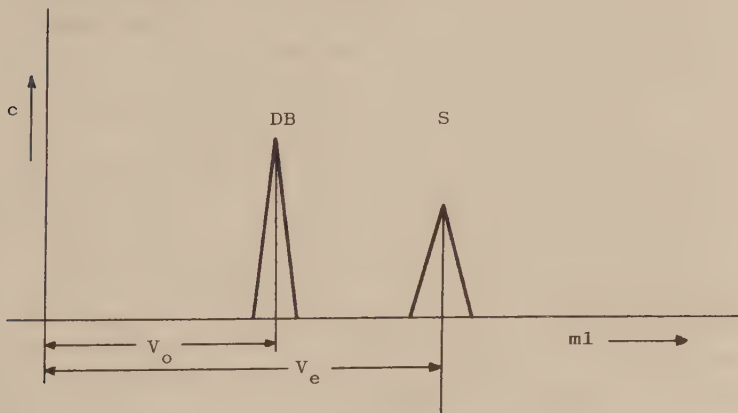
α) oberer Ausschlußgrenze

das sind die Molekülgrößen, die gerade nicht mehr in die "inneren Hohlräume" der Gelpartikel einzudringen vermögen; sie erscheinen mit der Lösungsmittelfront, also im oberen Ausschlußvolumen V_o ,

β) unterer Ausschlußgrenze

das sind alle Moleküle, denen auf Grund ihrer geringen Größe der gesamte Verteilungsraum der Säule zur Verfügung steht. Bei entsprechend stark quellenden Gelen erreicht diese Grenze ein Molekulargewicht von mehreren Tausend.

Abb. 1: Schema eines Elutionsdiagrammes der Substanzen Dextranblau (DB) und einer Substanz S zur Veranschaulichung der Größen V_o und V_e .



c = Konzentration der Stoffe im Eluat

DB = Peak einer Probe Dextranblau zur Bestimmung des V_o

S = Peak einer Substanz S, deren MG im Trennbereich der Säule liegt

Zeichnung verändert nach H. Determann (3)

b) Charakteristische Größen der Chromatographiesäule

Gesamtvolumen V_t der Säule

V_t berechnet sich aus der Grundfläche des Gelbettes multipliziert mit dessen Höhe h (siehe Abb. 2).

Elutionsvolumen V_e einer bestimmten Substanz

Das vom Start einer Substanz auf der Säule bis zu deren Erscheinen am anderen Ende ausfließende Volumen wird als V_e bezeichnet. Es ist für eine Substanz bei Verwendung derselben Säule konstant.

oberes Ausschlußvolumen V_o der Säule

V_o wird bestimmt, indem man einen hochmolekularen Stoff, dessen Moleküle nicht in die Gelporen einzudringen vermögen, durch das Gelbett passieren läßt. Das Elutionsvolumen dieser Substanz entspricht dem oberen Ausschlußvolumen V_o . Eine für diesen Zweck geeignete Substanz ist das Dextranblau mit einem Molekulargewicht von 2.000.000 (PHARMACIA).

Aus den leicht bestimmbaren Größen V_t , V_e und V_o läßt sich eine Verhältniszahl K_{av} berechnen:

Man geht dabei aus von der Grundgleichung der Verteilungschromatographie $V_e = V_o + K V_s$

wobei K die Verteilungskonstante einer Substanz für deren Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase (entsprechend V_o und V_s) darstellt.

Vernachlässigt man das Volumen des Dextrangerüstes der Gelpartikel und setzt $V_s = V_t - V_o$, so ergibt sich durch Einsetzen und Umformen

$$V_e = V_o + K_{av} (V_t - V_o)$$

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Der K_{av} -Wert ist also der Verteilungskoeffizient

zwischen mobiler und stationärer Phase. Er ist charakteristisch für eine bestimmte Substanz bei Verwendung eines bestimmten Geles. Er ist unabhängig vom Volumen des Gelbettes (V_t) und ermöglicht dadurch den Vergleich von Ergebnissen, die auf Chromatographiesäulen verschiedener Größe erzielt wurden (3,27), wie z.B. in der vorliegenden Arbeit bei Verwendung von Chromatographierohren unterschiedlicher Größe oder beim Vergleich eigener Ergebnisse mit denen anderer Autoren.

c) Beschreibung der Apparatur

Prinzipiell wäre die Säulenchromatographie ohne größeren apparativen Aufwand durchzuführen. Hilfseinrichtungen wie Pumpe, Photometer, Schreiber und Fraktionssammler dienen der exakteren und rascheren Handhabung und Auswertung der Versuche.

Der Aufbau des gesamten Systems gliedert sich folgendermaßen:

Aus dem Pufferreservoir (1.) saugt die Peristaltikpumpe (2.) das Elutionsmittel an und pumpt es in die Säule (3.). Der Adapter (4.) gestattet es, die Säulenhöhe genau der Höhe h des eingefüllten Gelbettes anzupassen, wodurch eine aufsteigende Chromatographie ermöglicht wird. Nach dem Verlassen der Säule fließt das Eluat durch die Küvette eines Photometers (5.), welches dessen Absorption im UV-Licht kontinuierlich mißt. Die Meßwerte werden über einen Verstärker (6.) an den Schreiber (7.) weitergeleitet. Der Fraktionssammler (8.) fängt das Eluat portionsweise auf. Jeder Fraktionswechsel wird vom Schreiber durch den Wechsel der Farben Rot/Blau dokumentiert. Die Fraktionsgröße kann nach Zeit, Volumen oder Tropfenzahl gewählt werden. (Die Ziffern (1.) bis (8.) entsprechen denen der Abb. 2)

Als Chromatographierohre dienen:

ein Rohr 26 mm ϕ , 1000 mm Länge, mit Kühlmantel, (PHARMACIA)

ein Rohr 15 mm ϕ , 600 mm Länge.

Über folgende Geltypen der Firma PHARMACIA wurde chromatographiert:

Sephadex G 50 medium

Sephadex G 15

Daten der verwendeten Gele:

Sephadex G 50: die obere Ausschußgrenze liegt bei dem Molekulargewicht 30.000, die untere bei 1.500.

Sephadex G 15: die obere Ausschußgrenze liegt bei dem Molekulargewicht 1.500.

(Angaben des Herstellers; gültig für Proteine bzw. Peptide) (27)

Die in das Gel eingebrachten Proben wurden mit PBS eluiert, die Absorption des Eluates bei 280 nm bzw. 256 nm kontinuierlich gemessen und mittels des Schreibers (Uvicord LKB) registriert. Zur Fraktionierung des Eluates diente der Fraktionssammler Ultrorack (LKB). Konstante Fließgeschwindigkeiten wurden mit einer Perpexpumpe der Firma LKB erreicht. Für das Gel Sephadex G 50 betrug sie rund 10 ml/h, bezogen auf 1cm^2 des Säulenquerschnittes, für das Gel Sephadex G 15 rund $16,5\text{ ml/cm}^2\text{h}$.

Zum Größenvergleich durch Gelchromatographie wurden folgende Substanzen über Sephadex G 15 chromatographiert:

2,5-Dinitrosalizylsäure	MERCK Nr. 800141 MG 246,13
N-Benzoyl-L-argininäthylester- hydrochlorid BAEE	MERCK Nr. 1672 MG 342,83
Serotonin-Kreatininsulfat	MERCK Nr. 7768 MG 405,43
Polymyxin B	PFIZER MG 1201-1203

Alle Substanzen absorbieren bei 256 nm. Bei BAEE handelt es sich um ein synthetisches Peptid, das normalerweise zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen verwendet wird.

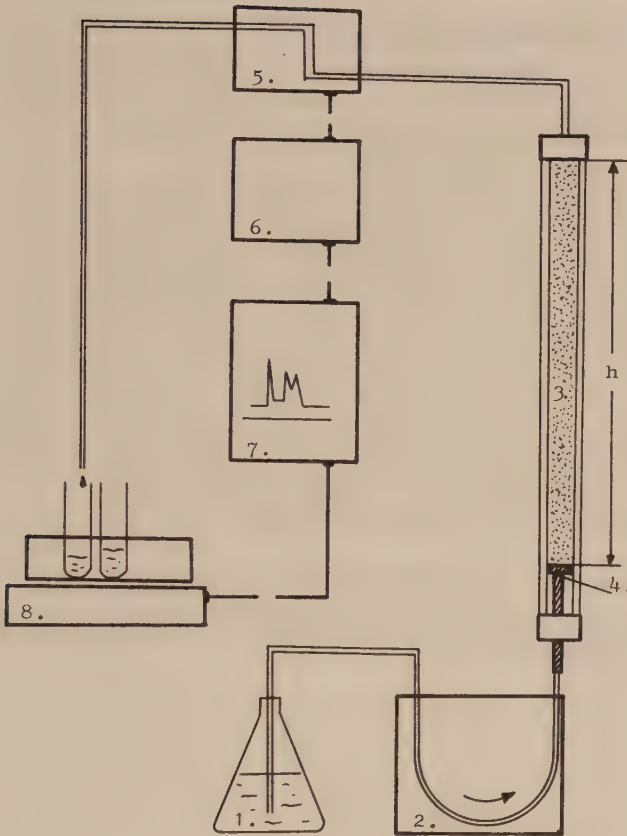


Abb. 2: Schematische Darstellung der Chromatographie-Apparatur.

1. Pufferreservoir, 2. Peristaltikpumpe, 3. Chromatographierohr, 4. Adapter, 5. Durchflußphotometer, 6. Verstärker, 7. Schreiber, 8. Fraktionssammler; h zeigt die Höhe des Gelbettes.

d) Präparation der Säule

Das Chromatographierohr wird senkrecht montiert und mit Puffer gefüllt. Die an der Glaswand haftenden Luftblasen werden durch vorsichtiges Rühren mit einem Glasstab abgelöst.

Das gewählte Gel wird nach den Angaben des Herstellers vorbereitet und in den aufmontierten Fülltrichter der Säule gegossen. Bereits jetzt wird die Pumpe eingeschaltet, die mit der für später vorgesehenen Fließgeschwindigkeit vom unteren Ende der Säule Puffer absaugt. Dadurch setzt sich das Gel sehr gleichmäßig ab. Nach ca. 24 Stunden wird die Pumpe ausgeschaltet und der Adapter ((4.) in Abb.2) vom offenen Ende der Säule her so weit gegen das Gelbett vorgeschoben, daß er diesem fest aufsitzt. Damit ist die Säule geschlossen und man kann nun die zu trennenden Proben aufbringen.

1.6. Test der zu untersuchenden Proben auf aktive Substanzen

1.6.1. Auslösung von Rhythmusstörungen am isolierten Ileum des Kaninchens

Der Versuch wurde nach der von Metz beschriebenen Methode (22) durchgeführt. Proben, die Kulturbestandteile enteropathogener Coli-Bakterien enthalten, führen zur Unterbrechung der rhythmischen Kontraktionen des Darmpräparates. (22,23)

1.6.2. Prüfung auf Durchlässigkeitserhöhung von Hautkapillaren

Zahlreiche Substanzen, darunter auch die Kulturfiltrate mancher enteropathogener Coli-Bakterien führen beim Kaninchen nach intradermaler Injektion zur vermehrten Durchlässigkeit der Hautgefäße, erkennbar am Übertreten eines hochmolekularen Farbstoffes aus der Blutbahn in das Gewebe. Das mit dieser Methode nachweisbare Coli-Toxin wurde von Evans (5) als Permeabilitätsfaktor (PF) beschrieben. Der Test erfolgte, wie von Rocha e Silva (28) beschrieben, mit eigenen Modifikationen.

a) Vorbereitung des Tierversuches

Die Rückenhaut eines Kaninchens wird mit einer elektri-

- schen Haarschneidemaschine schonend aber sorgfältig rasiert.

b) Injektion der Proben

Mindestens 12 Stunden nach der Rasur wird das Kaninchen mit einem Barbiturat (Nembutal^R) für die Zeit der Applikation in Kurznarkose gelegt. Von den steril-filtrierte Proben wird je 0,1 ml intracutan gespritzt. Dabei bildet sich eine deutliche Quaddel. Der Abstand der einzelnen Injektionen beträgt 2 bis 3 cm.

18 Stunden später werden dem Kaninchen 10 mg Evans-Blau je kg Körpergewicht i.v. injiziert.

c) Beurteilung des Testes

Nach weiteren 3 Stunden wird der Erfolg der Injektionen kontrolliert. Positive Proben führen zu einer Induration der durch die Injektion gesetzten Quaddel; das injizierte Evans-Blau führt zudem zu einer intensiv blauen Anfärbung.

Bei jedem Kaninchen werden sowohl eine positive als auch eine negative Kontrolle gespritzt, mit denen die Reaktion auf die zu untersuchenden Proben verglichen wird.

C) 2. Ergebnisse

2.1. Ergebnis der gelchromatographischen Auftrennung über Sephadex G 50

Aus vorhergehenden Versuchen war bekannt, daß die aktive Substanz im Kulturfiltrat nur bis zu einer Verdünnung von 1:2 sicher nachgewiesen werden kann. (12) Da durch die chromatographische Auftrennung zwangsläufig mit einer Verdünnung gerechnet werden muß, ergab sich die Notwendigkeit, die zu reinigende Substanz zunächst zu konzentrieren. Dies geschah durch Ausfällen von 300 bis 350 ml KF mit AMS.

Von der solchermaßen vorbehandelten Probe wurden 8 bis 10 ml, entsprechend etwa 2% des Gesamtvolumens V_t des Gelbettes, auf die Säule aufgebracht und mit PBS eluiert.

Die bei 280 nm gemessene Extinktion des Eluates zeigte 2 Maxima (Peaks)

Peak I bei $K_{av} = 0$

Peak II bei $K_{av} = 0,93$

Abb. 3



Abb. 3: Schema des Elutionsdiagramms der Versuche mit Sephadex G 50, gemessen bei 280 nm. Der Bereich, der den PF enthält ist durch +++ gekennzeichnet, Fraktionen mit positiver Reaktion am Kaninchenileum mit xxx

Untersuchung der gewonnenen Fraktionen auf
Permeabilitätsfaktor und Rhythmusänderungen

Zur Untersuchung des Eluates auf Permeabilitätsfaktor und Rhythmusänderungen wurden die eluierten Fraktionen des I. und II. UV-Peaks jeweils wieder zu einem Pool vereinigt und geprüft. Die bei der Gelchromatographie eluierten Substanzen konnten bereits in der Konzentration, in der sie im Eluat enthalten waren, auf der Haut des Albinokaninchens und am isolierten Kaninchenileum untersucht werden.

In den Fraktionen des I. Peak, entsprechend dem oberen Ausschlußvolumen des Gels, konnte der Permeabilitätsfaktor nachgewiesen werden. Im Test am isolierten Ileum des Kaninchens ließ sich zeigen, daß nur das Material des II. Peak Rhythmik und Kontraktilität des Darmpräparates zu beeinflussen vermochte.

2.2. Ergebnis der gelchromatographischen Auftrennung
über Sephadex G 15

Die vorangehenden Versuche mit Sephadex G 50 hatten gezeigt, daß das durch Präzipitation aus dem zellfreien Kulturüberstand erhaltene Material eine große Menge hochmolekularer Substanzen enthält. Da sie bei der Chromatographie über G 15 ohnehin im oberen Ausschlußvolumen V_0 der Säule ausgeschieden würden, zog ich vor, sie durch Ultrafiltration über eine Membran mit der Abscheidgrenze bei einem Molekulargewicht von ca. 10.000 aus der Probe zu entfernen. Dadurch konnte vermieden werden, daß die hochmolekularen Substanzen vom Ausschlußvolumen weg in den Bereich höherer K_{av} -Werte hinein "verschmierten", was zu Überlagerungen mit den tatsächlich aufgetrennten Substanzen, also zu deren erneuter Verunreinigung geführt hätte.

Die bei 256 nm (+) gemessenen Absorptionswerte ergaben 6 Peaks:

- | | |
|----------|---------------------|
| Peak I | bei $K_{av} = 0$ |
| Peak II | bei $K_{av} = 0,37$ |
| Peak III | bei $K_{av} = 0,61$ |
| Peak IV | bei $K_{av} = 0,81$ |
| Peak V | bei $K_{av} = 1,1$ |
| Peak VI | bei $K_{av} = 2,1$ |

Abb. 4

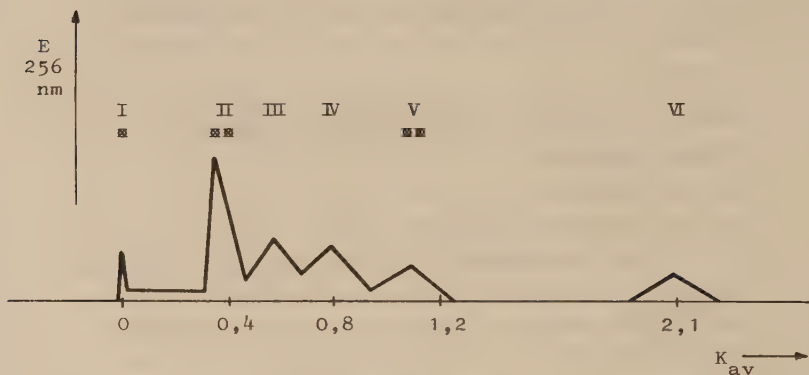


Abb. 4: Schema des Elutionsdiagrammes der Versuche mit Sephadex G 15, gemessen bei 256 nm. Die mit ■ markierten Peaks enthalten Substanzen, welche am Kaninchenileum zu einer positiven Reaktion führen.

(+) Aus technischen Gründen wurden die Versuche mit G 15 an einer anderen Apparatur durchgeführt, deren Photometer nicht bei 280 nm mißt, sondern bei 256 nm.

Test der gewonnenen Fraktionen auf aktive Substanzen

Wie aus den Versuchen mit der Membran-Ultrafiltration (Tabellen 2 und 3) ersichtlich, erübrigt sich bei den vorliegenden Fraktionen der Nachweis des PF, da die aufgetrennte Probe dem Material der Ultrafiltrationsfraktionen 4 und 5 entspricht.

Aus dem Test am Kaninchenileum ging hervor, daß aktive Substanz im Bereich des I., II. und V. Peak eluiert wurde. Die Strecke zwischen I. und II. Peak, der III., IV. und VI. Peak waren negativ.

2.3. Ergebnis der Membran-Ultrafiltration

Test der durch Ultrafiltration gewonnenen Fraktionen auf aktive Substanzen:

Untersuchung auf der Haut des Albino-Kaninchens

Tabelle 2					
Fraktion	1	2	3	4	5
Nachweis von PF	+	+	-	-	-

In den Fraktionen 1 und 2, welche die hochmolekularen Bestandteile des KF enthalten, konnte der PF nachgewiesen werden; die Fraktionen 3 bis 5 zeigten negative Reaktion.

Tabelle 3					
Fraktion	1	2	3	4	5
Auslösung von Rhythmusstörung	-	-	-	+	+

Im Test am isolierten Kaninchenileum zeigten die hochmolekularen Fraktionen 1 bis 3 negative, die niedermolekularen Fraktionen 4 und 5 positive Reaktion.

Die Tabellen 2 und 3 zeigen, daß aktive Substanz in vier verschiedenen Fraktionen gefunden werden konnte. Entsprechend den beiden angewandten Testsystemen, Test auf PF und Test auf die Auslösung von Rhythmusstörungen, lassen sich diese vier Fraktionen in zwei Gruppen zu-

sammenfassen: die eine bestehend aus den Fraktionen 1 und 2, PF positiv, am Kaninchenileum negativ, die andere bestehend aus den Fraktionen 4 und 5, PF negativ, am Kaninchenileum positiv. In der Fraktion 3, entsprechend einem Molekulargewicht von 10.000 bis 50.000 konnte weder am isolierten Kaninchenileum noch im Test auf den PF aktive Substanz nachgewiesen werden.

2.4. Vergleich der Ergebnisse aus Ultrafiltration und Gelchromatographie über Sephadex G 50

Ich fasse den I.UV-Peak der Chromatographie über Sephadex G 50 und die Fraktionen 1 und 2 aus der Ultrafiltration unter dem Begriff "hochmolekulares Toxin" HMT zusammen, die Fraktionen 4 und 5 der Ultrafiltration und den II. Peak der Chromatographie über Sephadex G 50 unter dem Begriff "niedermolekulares Toxin" NMT.

hochmolekulares Toxin HMT

entspricht dem I.UV-Peak der Säulenchromatographie und den Fraktionen 1 und 2 der Ultrafiltration

Test auf den PF	Test am isol. Kaninchenileum
positiv	negativ

niedermolekulares Toxin NMT

entspricht dem II. Peak der Säulenchromatographie und den Fraktionen 4 und 5 der Ultrafiltration

Test auf den PF	Test am isol. Kaninchenileum
negativ	positiv

2.5. Eigenschaften der Coli-Toxine

Um Aufschluß über das Verhalten der untersuchten aktiven Substanzen, HMT und NMT, gegenüber Hitze, Säure, Pronase und homologem Antiserum zu erhalten, wurden HMT und NMT entsprechend den unter 1.3. b-f beschriebenen Ansätzen behandelt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4		
	HMT	NMT
Neutralisierbarkeit durch Antiserum	+ (4)	- (4)
Antigenes Material in den Fraktionen nachweisbar	+ (8)	- (5)
Hitzestabilität	- (5)	+ (4)
Beständigkeit gegenüber Säure	- (5)	+ (2)
Beständigkeit gegenüber Pronase	- (2)	+ (5)

Verhalten von HMT (hochmolekularem Toxin) und NMT (niedermolekularem Toxin) gegenüber physikalischen und chemischen Einwirkungen und gegenüber Antiserum gegen lebende Bakterien.

Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der durchgeführten Versuche an.

Aus der Tabelle geht hervor, daß das HMT durch die Behandlung mit Säure, Pronase und durch Kochen über 10 min seine Aktivität verliert, die des NMT jedoch nicht beeinflußt wird.

Die Präparationen des KF, welche den die Darmrhythmusstörungen verursachenden Faktor enthielten, erschienen bei der Immundiffusion mit Serum gegen lebende Bakterien frei von antigenen Bestandteilen.

2.6. Versuche zur annähernden Bestimmung des Molekulargewichtes der aktiven Substanz

Durch die Verwendung von Ultrafiltrationsmembranen definierter Porenweite ist bereits eine grobe Abgrenzung des Molekulargewichtes möglich. Wie bereits unter 2.3. auf-

geführt, werden aktive Substanzen in den Ultrafiltrations-Fractionen 1,2,4 und 5 gefunden. Das entspricht Molekulargewichtsbereichen von >100.000 , 50.000 bis 100.000 , 1.000 bis 10.000 und <1.000 . Der Nachweis des Toxines erfolgte für Molekulargewichte >50.000 durch den Test auf den PF, für Molekulargewichte <10.000 durch den Test am isolierten Kaninchen-ileum.

Die Ergebnisse der Gelchromatographie erlauben eine erste, grobe Abschätzung der Molekülgröße, wenn man die vom Hersteller angegebenen Ausschlußgrenzen des speziellen Gels zum Vergleich heranzieht. Substanzen, deren Molekulargewicht im Trennbereich der Säule liegt, können so aber nicht erfaßt werden. Dazu ist es notwendig, Vergleichssubstanzen bekannten Molekulargewichtes zu eluieren. Aus dem gemessenen Elutionsvolumen V_e wird der zugehörige K_{av} -Wert berechnet. Vergleicht man nun die Werte unbekannter Substanzen mit denen der Vergleichssubstanzen, so können Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der untersuchten Stoffe gezogen werden.

Versuche mit Sephadex G 50

Wie unter 2.1. beschrieben, ergaben sich dabei 2 Peaks, deren erster mit dem oberen Ausschlußvolumen eluiert wurde, und der das HMT enthält. Betrachtet man die vom Hersteller (PHARMACIA) für Proteine angegebenen Werte für die Ausschlußgrenzen, so liegt im I. Peak Substanz mit einem Molekulargewicht von mehr als 30.000 vor. Dies stimmt mit den Versuchen der Membran-Ultrafiltration überein, die für HMT ein Molekulargewicht von mehr als 50.000 ausweisen.

Versuche mit Sephadex G 15

Aus dem Elutionsdiagramm der Versuche mit G 15 geht hervor, daß die niedermolekularen Anteile des AMS-Präzipitates aus dem Kulturüberstand durch dieses Gel aufgetrennt werden. Die Probe wurde durch Ultrafiltration

über die Membran PM-10 (Abtrenngrenze bei dem Molekulargewicht 10.000) vorgereinigt. Um die im Trennbereich der Säule eluierten Substanzen größtmäßig erfassen zu können, wurden Vergleichssubstanzen bekannten Molekulargewichts chromatographiert und die zugehörigen K_{av} -Werte berechnet.

Tabelle 5

Durch Chromatographie über Sephadex G 15 ermittelte K_{av} -Werte für Vergleichssubstanzen bekannten Molekulargewichtes.

Substanz	Molekulargewicht	K_{av} -Wert
Polymyxin	1200	0,15
Serotonin-Kreatininsulfat	405	0,65
BAEE (+)	342	1,21
2,5-Dinitrosalizylsäure	246	3,7

Die Projektion der K_{av} -Werte für die Vergleichssubstanzen (oberes Diagramm der Abb. 5) in das untere Diagramm zeigt, daß keiner der Werte für die Vergleichssubstanzen mit dem eines Peaks des unteren Diagrammes zusammenfällt.

Der Peak I erscheint im oberen Ausschlussvolumen der Säule. Für die darin enthaltenen Substanzen ist ein Molekulargewicht von ca. 1.500 bis 10.000 (entsprechend der Vorreinigung mit der Ultrafiltrationsmembran PM-10) zu erwarten. Der Peak II kommt im Diagramm zwischen die Peaks der Vergleichssubstanzen mit dem Molekulargewicht 405 und 1.200 zu liegen. Für die in Peak II enthaltenen Substanzen wäre also ein Molekulargewicht von ca. 500 bis 1.000 zu erwarten. Der Peak V liegt zwischen den Peaks der Substanzen mit dem Molekulargewicht 342 und 405, sehr nahe bei dem Peak von 342, sodaß für die in Peak V enthaltenen Substanzen ein Molekulargewicht von ca. 350 angenommen werden kann.

(+) BAEE= N-Benzoyl-L-argininäthylesterhydrochlorid

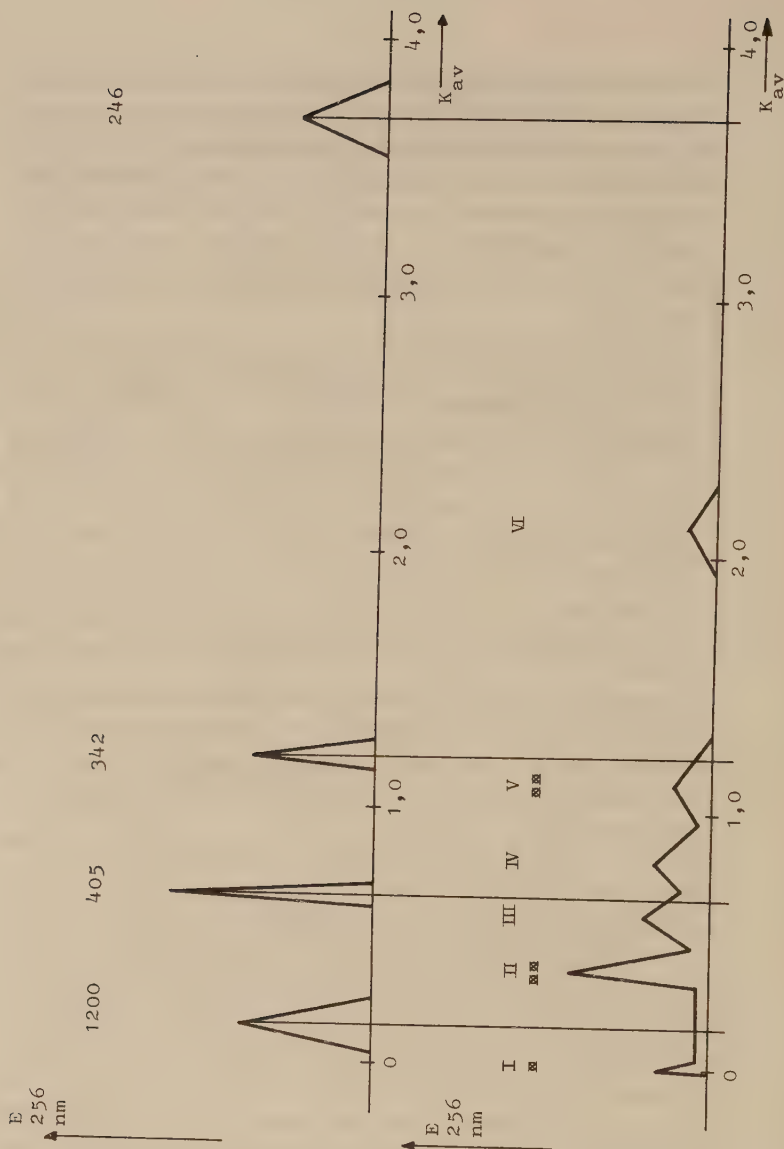


Abbildung 5

oben: Schema der Elutionsdiagramme der Vergleichs-
substanzen, deren Molekulargewicht über den Peaks
angegeben ist. Verwendetes Gel: Sephadex G 15.
unten: Schema des Elutionsdiagrammes der mit AMS konzen-
trierten und über PM-10 ultrafiltrierten Probe.
Verwendetes Gel: Sephadex G 15. Bereiche, die am Kanin-
chenileum zu positiver Reaktion führen, sind durch x
gekennzeichnet. (Über den Peaks die fortlaufenden Nummern
wie auf Seite 18)

D) Diskussion

Joan Taylor berichtete 1958 (31), daß mittels des Ligaturtestes am Kaninchen enteropathogene Stämme von *E.coli* von nicht enteropathogenen zu unterscheiden seien. Sie ging dabei davon aus, daß der Effekt an die Anwesenheit lebender Enteritis-Colibakterien im Darm gebunden sei. In den folgenden Jahren wurden von verschiedenen Autoren unter Annahme eines möglichen Coli-Toxines eine Vielzahl von Methoden beschrieben, mit denen versucht wurde, dieses Toxin nachzuweisen, zu konzentrieren und zu reinigen. Im wesentlichen handelt es sich bei den Nachweismethoden um Versuchsanordnungen, in denen der Dünndarm von Versuchstieren in vivo (4,10,17) oder in vitro (22) zum Nachweis eines Toxines herangezogen wird, oder um solche, bei denen die Toxinwirkung auf die Permeabilität von Hautkapillaren (5,6) oder auf Zellkulturen (20) beobachtet wird. Als Reinigungsmethoden werden Gelchromatographie über verschiedene Gele (7,21,25,26) und Ultrafiltration (2,26) beschrieben, für die Konzentrierung des Toxines aus der Kulturflüssigkeit waren es Ultrafiltration (17,21), Lyophilisation (25,26) und Präzipitation mit Protaminsulfat (5) und Ammoniumsulfat (4). Unter Einsatz dieser Methoden gelang es, 2 von *E.coli* gebildete Toxine nachzuweisen, ein stabiles, niedermolekulares Toxin und ein labiles, hochmolekulares.

Metz (22) weist in einer eigenen Versuchsanordnung am isolierten Kaninchenileum ebenfalls ein Coli-Toxin nach. Diese Versuchsanordnung wurde in der vorliegenden Arbeit übernommen. Dabei ließ sich zeigen, daß das Verhalten des hierdurch nachgewiesenen Toxins gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen mit dem der von anderen Autoren (4,13,17,25,29) beschriebenen, niedermolekularen, stabilen Toxine übereinstimmt. Es handelt sich um ein Toxin, das gegenüber Hitze, Säure bzw. Pronase stabil ist und durch homologes Antiserum nicht inaktiviert wird. Diese Gemeinsamkeiten lassen einen Vergleich der in verschiedenen anderen Versuchsanord-

nungen nachgewiesenen, niedermolekularen Toxine als naheliegend erscheinen.

Unser Bakterienstamm H 10407, wir erhielten ihn von Evans, bildet stabiles und labiles Toxin; bei letzterem kann ein Permeabilitätsfaktor nachgewiesen werden (4,5,6). Evans (5) verglich den Test auf den Permeabilitätsfaktor durch intradermale Injektion mit dem Ligaturtest am Kaninchen, und konnte dabei zeigen, daß der Permeabilitätsfaktor mit dem labilen Toxin identisch zu sein scheint. Ligaturtest und Test auf den Permeabilitätsfaktor zeigten dieselbe Dosis-Wirkungs-Kurve, labiles Toxin und Permeabilitätsfaktor waren beide hitzelabil und durch dasselbe Antiserum gegen E.coli zu neutralisieren. Da sich während meiner Versuche alsbald abzeichnete, daß das labile, hochmolekulare Toxin durch den Test am Kaninchenileum nicht nachzuweisen ist, gingen wir dazu über, stellvertretend für das hochmolekulare Toxin den Permeabilitätsfaktor zu bestimmen.

Zur Untersuchung der gewonnenen Proben auf aktive Substanzen kamen also zwei Testmethoden zur Anwendung: Intradermale Injektion der Probe zum Nachweis des Permeabilitätsfaktors und Test auf Auslösung von Rhythmusstörungen am isolierten Ileum des Kaninchens. Beide Verfahren wurden ausschließlich nach qualitativen Gesichtspunkten ausgewertet.

Um die Ergebnisse des Testes auf den Permeabilitätsfaktor richtig auswerten zu können, wurden jedem Versuchstier Kulturfiltrate von enteropathogenen (positiven) bzw. apathogenen (negativen) Coli-Stämmen gespritzt. Die durch die injizierten Proben hervorgerufenen Quaddeln wurden dann jeweils mit denen der Kontrollinjektionen verglichen.

Die Beurteilungskriterien für den Test am isolierten Kaninchenileum waren die Störung von Kontraktilität und Kontraktionsrhythmus des Darmpräparates, abzulesen aus der aufgezeichneten Kurve, und die Reversibilität der Veränderungen nach dem Absaugen der Proben und Spülen des Darmes mit NaCl-Lösung. Die Aussage des Ver-

suches ist umso sicherer, je vollständiger reversibel die Veränderungen sind. Diese Beurteilung hat natürlich einen exakten Ausgangswert zur Voraussetzung: Nur solche Darmstücke können Verwendung finden, die von Versuchsbeginn an eine sehr gleichmäßige Aktion zeigen.

Durch die Auftrennung der aktiven Substanzen in ein hochmolekulares und ein niedermolekulares Toxin wurde es möglich, die Aussagen der angewandten Testmethoden zu präzisieren. War für den Test auf den Permeabilitätsfaktor bereits bekannt, daß er spezifische Aussagen über das hochmolekulare Toxin ermöglicht, das niedermolekulare Toxin jedoch nicht erfaßt (5), so erwies sich nun, daß der Test am isolierten Ileum des Kaninchens selektiv auf das niedermolekulare Toxin anspricht. An 40 untersuchten Stämmen, enteropathogen für Schweine, konnten Smith und Gyles (29) zeigen, daß Enteritis-Colibakterien entweder stabiles Toxin (entsprechend dem niedermolekularen Toxin) allein oder zusammen mit labilem Toxin (entsprechend dem hochmolekularen Toxin) produzieren, nie jedoch allein das labile Toxin. Der Test am isolierten Ileum des Kaninchens vermag demnach alle enteropathogenen Stämme von E.coli zu erfassen.

Die Fraktionierung des Kulturfiltrates wurde mit zwei verschiedenen Methoden versucht, der Membran-Ultrafiltration und der Gelchromatographie über Sephadex Gele, die beide nach der Molekülgröße auftrennen. Chromatographie über Sephadex G 50 und Ultrafiltration erbrachten eine Trennung des Kulturfiltrates in jeweils eine Gruppe hochmolekularer und eine Gruppe niedermolekularer Substanzen, die vereinfachend als hochmolekulares und als niedermolekulares Toxin bezeichnet wurden.

Aus den Untersuchungen über das Verhalten des hochmolekularen Toxins gegenüber Hitze, Säure und Pronase ging hervor, daß die Aktivität dadurch zerstört wurde.

Das hochmolekulare Toxin erwies sich als antigen und als neutralisierbar durch Antiserum. Diese Ergebnisse scheinen wiederum vergleichbar mit denen anderer Autoren (4,13,20,21), die ein labiles Toxin, vergleichbar meinen Präparationen von hochmolekularem Toxin gefunden hatten. Das niedermolekulare Toxin erwies sich, wie eingangs bereits erwähnt, als stabil gegenüber Hitze, Säure und Pronase und weder als Antigen noch als neutralisierbar.

Um durch die gelchromatographische Auftrennung der Kulturfiltrate die Toxine nicht übermäßig zu verdünnen, versuchte ich die aktiven Substanzen durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat aus dem Kulturfiltrat zu konzentrieren. Nach Evans (4) enthält das Präzipitat praktisch die gesamte enterotoxische Aktivität des Kulturfiltrates, hochmolekulares ebenso wie auch niedermolekulares Toxin. Im Widerspruch dazu steht die Aussage von Mitchell (26), daß bei der Präzipitation mit Salzen nur 10% der aktiven Substanz im Präzipitat enthalten seien. Die Tatsache, daß das niedermolekulare Toxin im II. Peak der Chromatographie über Sephadex G 50, der das 20-fache Volumen der aufgebrauchten Probe hat, im Test am isolierten Kaninchenileum noch sicher nachweisbar ist, spricht dafür, daß doch weit mehr als 10% der aktiven Substanz im Präzipitat enthalten sind. Das niedermolekulare Toxin ist am Kaninchenileum nur bis zu einer Verdünnung des Kulturfiltrates von 1:2 sicher nachweisbar.

Zahlreiche Publikationen befassen sich mit dem Molekulargewicht von niedermolekularem und hochmolekularem Toxin (7,13,17,21,26). Wie bereits von Larivière (21) berichtet, fand auch ich als untere Grenze des Molekulargewichtes für das hochmolekulare Toxin 50.000. Mitchell (26) und Larivière (21) vermochten zu zeigen, daß die obere Grenze bei mehreren Millionen liegen kann.

Im Bereich von Molekulargewicht 10.000 bis 50.000 waren in meinen Versuchen mit beiden angewandten Testmethoden keine aktiven Substanzen nachzuweisen. D.J.Evans (7)

konnte zeigen, daß bei der Behandlung gewaschener Bakterien des Stammes H 10407 mit Polymyxin B ein hitzelabiler, durch Antiserum neutralisierbarer Permeabilitätsfaktor freigesetzt wird, der im Kulturfiltrat, ohne die Behandlung mit Polymyxin B nicht zu finden ist. Evans schließt daraus, daß dies evtl. die ursprüngliche Form des Toxins sei, die aus den Zellen aber normalerweise nur als Polymer oder aggregiert an andere hochmolekulare Substanzen abgegeben wird. So wäre auch der weite Molekulargewichtsbereich zu erklären, in dem das hochmolekulare Toxin gefunden wird.

Jacks (16), Gyles (13) und Mitchell (26) berichten, daß das niedermolekulare Toxin die PM-10 Membran passiert. Mitchell findet das niedermolekulare Toxin auch im Filtrat der UM-2 Membran, während Jacks feststellt, daß es durch eben diese Membran retiniert wird. Da die Abtrenngrenze einer Ultrafiltrationsmembran nicht scharf ist, werden Substanzen umso vollständiger retiniert, je weiter ihr Molekulargewicht über der Abtrenngrenze liegt. Die größte Unschärfe besteht für Substanzen, deren Molekulargewicht um die Abtrenngrenze der Membran liegt. In diesem Fall wird ein Teil retiniert, ein Teil filtriert, d.h. die Substanz kann sowohl im Filtrat als auch im Überstand enthalten sein. Dem ließe sich prinzipiell begegnen, indem man den Überstand über der Membran z.B. mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung auffüllt und dann abermals filtriert. Bei mehrmaliger Wiederholung wird der Überstand von niedermolekularen Bestandteilen praktisch vollkommen gereinigt. Dieses Verfahren findet aber seine Grenzen, wenn durch die langsame Filtrationsgeschwindigkeit z.B. der UM-2 Membran der Vorgang sehr viel Zeit in Anspruch nehmen würde. Ich verzichtete darauf, da die Filtration von 2 bis 3 ml Kulturfiltrat über die Membran UM-2 bereits Stunden dauert.

Mein Ergebnis der Ultrafiltration über die Membran UM-2 ließ bereits vermuten, daß das niedermolekulare Toxin

aus mehreren Substanzen besteht, denn sowohl Überstand als auch Filtrat zeigten im Test am isolierten Kaninchenileum positive Reaktion. Es wird erhärtet durch die Aussagen der Gelchromatographie über Sephadex G 15. Die dabei aufgetrennten Proben wurden mit Ammoniumsulfat konzentriert und durch Ultrafiltration über eine PM-10 Membran von den hochmolekularen Bestandteilen vorgereinigt. Das Elutionsdiagramm weist 6 Peaks aus, von denen 3 mit toxischen Substanzen in Zusammenhang gebracht werden konnten; sie liegen bei den K_{av} -Werten 0 (entsprechend dem oberen Ausschlußvolumen), 0,37 und 1,1. Zwischen diesen Peaks war das Eluat frei von aktiver Substanz. Daraus läßt sich schließen, daß das niedermolekulare Toxin aus wenigstens 3 verschiedenen großen Komponenten besteht. Mitchell (26), der sehr konzentrierte und stark durch hochmolekulare Substanzen verunreinigte Proben über Sephadex G 10 chromatographierte, fand dabei 4 Peaks; die enterotoxische Substanz war auf die Peaks 1 bis 3 verteilt. Eine exakte Zuordnung der enterotoxischen Substanz zu einzelnen Peaks war nicht möglich. Er schließt aber auf ein Molekulargewicht von 333 oder 380. Dies stimmt zumindest der Größenordnung nach überein mit dem kleinsten von mir gefundenen Toxin, dessen Molekulargewicht bei ca. 350 liegen dürfte. Für zwei weitere Komponenten fand ich Werte von ca. 500 bis 1.000 und ca. 1.500 bis 10.000 (entsprechend der oberen Ausschlußgrenze von Sephadex G 15 und der Vorreinigung der Probe durch Ultrafiltration über eine PM-10 Membran mit der Abtrenngrenze bei einem Molekulargewicht von 10.000). In diesem Zusammenhang ist jedoch zu beachten, daß die Gelchromatographie nach der räumlichen Größe auftrennt. Diese ist zwar weitgehend mit dem Molekulargewicht einer Substanz korreliert, besondere sterische Konfigurationen können jedoch zu irreführenden Resultaten leiten. So liegt z.B. die obere Ausschlußgrenze von Sephadex G 200 für Proteine bei dem Molekulargewicht 800.000, für Dextrane dagegen nur bei 200.000 (27). Es muß daher gefordert

werden, daß zur Bestimmung des Molekulargewichtes verwendete Vergleichssubstanzen aus derselben Stoffklasse stammen sollten, wie die zu untersuchenden. Bei analytischem Vorgehen mit unbekannten Stoffen ist dies naturgemäß problematisch. Obgleich daher eine exakte Bestimmung des Molekulargewichtes der 3 Komponenten nicht gelang, war es doch möglich, einen Molekulargewichtsbereich, von ca. 350 bis ca. 10.000 abzustecken, in welchem wiederum einige bekannte Substanzen liegen, die sicher zu einer Irritation glatter Muskulatur führen, so z.B. die Kinine, Acetylcholin, Serotonin und Histamin (14). Einige Autoren konnten zeigen, daß durch verschiedene Bakterien Histamin freigesetzt wird (1,15). Hochmolekulare bakterielle Toxine wurden von anderen Autoren als Histaminliberatoren beschrieben, so z.B. Staphylokokken-Toxin (8), das Toxin von *Clostridium septicum* und *Clostridium welchii* (19), sowie die Endotoxine gramnegativer Bakterien wie *E.coli* und *Salmonella typhi* (32). Weiterhin wurden aus Bakterien isolierte Polypeptide als potentielle Histaminliberatoren erkannt, z.B. Licheniformin und Polymyxin (14). Die Peptide Polymyxin, Licheniformin und die Kinine, sowie die biogenen Amine Serotonin und Histamin entsprechen dem Molekulargewicht nach Größenordnungsmäßig in etwa dem nachgewiesenen niedermolekularen Toxin. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß es sich dabei evtl. um ähnliche Substanzen handeln könnte.

E) Zusammenfassung

Aus den Arbeiten anderer Autoren war bekannt, daß von enteropathogenen Stämmen von *Escherichia coli* ein hochmolekulares, labiles Toxin und ein niedermolekulares, stabiles Toxin gebildet wird. Das labile, hochmolekulare Toxin kann durch den Test auf den Permeabilitätsfaktor durch intradermale Injektion in die Rückenhaut eines Albinokaninchens nachgewiesen werden, das stabile, niedermolekulare Toxin im Test auf Auslösung von Rhythmusstörungen am isolierten Kaninchenileum.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Toxine des humanpathogenen Stammes H 10407 durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat, durch Membran-Ultrafiltration und Säulenchromatographie zu reinigen, sowie die Beständigkeit der Toxine gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen zu prüfen. Das hochmolekulare Toxin erwies sich dabei als labil gegenüber Hitze, Säure und Pronase, es war Antigen und durch homologes Antiserum zu neutralisieren. Das niedermolekulare Toxin war durch Hitze, Säure und Pronase nicht zu zerstören und weder antigenwirksam noch durch Antiserum neutralisierbar. Es gelang, das niedermolekulare Toxin chromatographisch aufzutrennen und dadurch 3 Komponenten zu isolieren, die am isolierten Kaninchenileum nachgewiesen werden konnten. Durch den Vergleich der chromatographisch ermittelten K_{av} -Werte der 3 Komponenten mit den K_{av} -Werten von Vergleichssubstanzen bekannten Molekulargewichtes konnte das Molekulargewicht der Komponenten auf die Bereiche 1.500 bis 10.000, 500 bis 1.000 und ca. 350 eingegrenzt werden.

F) Literaturverzeichnis

1. ACKERMANN, D.: Über den bakteriellen Abbau des Histidins. Hoppe Seylers Z.physiol.Chem. 65 (1910) 505
2. BYWATER, R.J.: Dialysis and ultrafiltration of a heat-stable enterotoxin from *Escherichia coli*. J.Med.Microbiol. 5 (1972) 337
3. DETERMANN, H.: Gelchromatographie. Springer Verlag
4. EVANS, D.G., D.J.EVANS, JR., und N.F.PIERCE: Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. Infect.Immunity 7 (1973) 873
5. EVANS, D.J., JR., D.G.EVANS, und S.L.GORBACH: Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. Infect.Immunity 8 (1973) 725
6. EVANS, D.G., D.J.EVANS, JR., und S.L.GORBACH: Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* and serum antitoxin activity by the vascular permeability factor assay. Infect.Immunity 8 (1973) 731
7. EVANS, D.J., JR., D.G.EVANS, und S.L.GORBACH: Polymyxin B-induced release of low-molecular-weight, heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. Infect.Immunity 10 (1974) 1010
8. FELDBERG, W., und W.V.KEOGH: Liberation of histamine from the perfused lung by staphylococcal toxin. J.Physiol.(Lond.) 90 (1937) 280
9. GORBACH, S.L.,M.D.: Acute diarrhea - a "toxin" disease? N.Engl.J.Med. 287 (1972) 791

10. GORBACH, S.L. und C.M.KHURANA: Toxigenic *Escherichia coli*. A cause of infant diarrhea in Chicago.
N.Engl.J.Med. 287 (1972) 791
11. GORBACH, S.L., M.D., B.H.KEAN, M.D., D.G.EVANS, Ph.D.,
D.J.EVANS, JR., Ph.D., und D.BESSUDO, QBP, M.Sc.:
Travellers' diarrhea and toxigenic *Escherichia coli*.
N.Eng.J.Med. 292 (1975) 933
12. GRASSER, I.: Promotionsarbeit. Medizinische
Fakultät der Universität München, 1976.
13. GYLES, C.L., D.V.M., Ph.D.: Discussion: heat-labile
and heat-stable forms of the enterotoxin from *E.coli*
strains enteropathogenic for pigs.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 176 (1971) 314
14. Handbuch der experimentellen Pharmakologie.
Springer Verlag.
15. HANKE, M.T., und K.K.KOESSLER: Studies on proteino-
genous amines. XVII. On the faculty of normal in-
testinal bacteria to form toxic amines.
J.biol.Chem. 59 (1924) 835
- - : Studies on proteinogenous amines. XVIII.
On the production of histamine, tyrosine, and phenol
in common laboratory media by certain intestinal
microorganisms. J.biol.Chem. 59 (1924) 855
16. JACKS, T.M., B.J.WU, A.D.BRAEMER und D.E.BIDLACK:
Properties of the enterotoxic component in
Escherichia coli enteropathogenic for swine.
Infect.Immunity 7 (1973) 178
17. JACKS, T.M., und B.J.WU: Biochemical properties of
Escherichia coli low-molecular-weight, heat stable
enterotoxin. Infect.Immunity 9 (1974) 342

18. KAUFFMANN, F.: "Über die Coli-Enteritis der Säuglinge".
Wien.med.Wschr. 101 (1951) 286
19. KELLAWAY, C.H., und W.TURNER: The liberation of
histamine and of adenyly compounds by the toxin
of *Cl.welchii* type D. Aust.J.exp.Biol.med.Sci.
18 (1940) 253

- - , G.REID und E.R.TRETHEWIE: Circulatory and
other effects of the toxin of *Cl.septica*.
Aust.J.exp.Biol.med.Sci. 19 (1941) 63
20. KWAN, C.N., und R.M.WISHNOW: *Escherichia coli*
enterotoxin-induced steroidogenesis in cultured
adrenal tumor cells. Infect.Immunity 10 (1974) 146
21. LARIVIERE, S., C.L.GYLES, und D.A.BARNUM:
Preliminary characterization of the heat-labile
enterotoxin of *Escherichia coli* F 11 (P 155).
J.Infect.D. 128 (1973) 312
22. METZ, H.: Über die colibedingte Säuglingsenteritis.
V. Mitteilung: Untersuchungen am isolierten Kanin-
chendarm mit Voll- und Teilantigenen von normalen
und enteropathogenen Colikeimen. Zbl.Bakt.Hyg.,
I.Abt.Orig.A 222 (1972) 290
23. METZ, H., D.BONU, und H.OHGKE: Die Wirkung menschen-
- und tierpathogener Colistämme auf den isolierten
Kaninchendarm. Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.A 226 (1974)
215
24. METZ, H., H.OHGKE und I.GRASSER: Zur Toxinproduktion
enteropathogener Colibakterien bei Erwachsenen.
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.A 232 (1975) 252

25. MITCHELL, I.de G., M.J.TAME und R.KENWORTHY:
Conditions for the production of *Escherichia coli*
enterotoxin in a defined medium. *J.Med.Microbiol.*
7 (1974) 395
26. MITCHELL, I.de G., M.J.TAME und R.KENWORTHY:
Separation and purification of enterotoxins from
a strain *Escherichia coli* pathogenic for pigs.
J.Med.Microbiol. 7 (1974) 439
27. PHARMACIA FINE CHEMICALIS: Sephadex^R gelfiltration
in theory an practice.
Uppsala, Sweden; Februar 1973 - 10
28. ROCHA E SILVA, M. und J.GO: Chemical mediators of
the acute inflammatory reactions.
Oxford/New York 1972, p. 56-99
29. SMITH, H.W., und C.L.GYLES: The relationship between
two apparently different enterotoxins produced by
enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of
porcine origin. *J.Med.Microbiol.* 3 (1970) 387
30. SMITH, H.W., und S.HALLS: The transmissible nature
of the genetic factor in *Escherichia coli* that con-
trols enterotoxin production. *J.Gen.Microbiol.* 52
(1968) 319
31. TAYLOR, J., M.P.MALTBY und J.M.PAYNE: Factors in-
fluencing the response of ligated rabbit-gut seg-
ments to injected *Escherichia coli*. *J.Path.Bact.*
76 (1958) 491
32. WEIL, M.H., und W.W.SPINK: A comparison of shock
due to endotoxin with anaphylactic shock.
J.Lab.clin.Med. 5 (1957) 501

Herrn Prof. Dr. Metz danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, ganz besonders auch für die stets gewährte Beratung und Unterstützung.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Max v. Pettenkofer-Institutes für die freundliche Hilfe, vor allem Herrn Dr. Ohgke, sowie Herrn Dr. Otto vom Institut für Physiologische Chemie der Universität München.

Lebenslauf

Am 3. November 1950 wurde ich, Wolfgang Reichel, als Kind des praktischen Arztes Dr. Emil Reichel und dessen Gattin Else, geb. Zollfrank, in Selb geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule in Selb, anschließend für 9 Jahre das Mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium Selb, an dem ich 1970 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1970 begann ich an der Universität Würzburg das Studium der Medizin. Im Sommersemester 1971 bestand ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, im Wintersemester 1972/73 die Ärztliche Vorprüfung. Nach dem ersten klinischen Semester wechselte ich an die Universität München, wo ich am 15. September 1976 die Ärztliche Prüfung ablegte.

Dissertationsdruck
GmbH & Co. KG.

Schadel & Wehle

86 Bamberg · Hohe-Kreuz-Str. 9b · Tel. 0951/21617[5 4414]